L'EMBRYON DE CARPE EN SEGMENTATION: UN MODÈLE EXPÉRIMENTAL POUR L'ÉTUDE TOXICOLOGIQUE DU CYCLE CELLULAIRE

par

Catherine CHAILLOU (1), Bruno LEFÈBVRE (1), Djadja SJAFEI (2) et Pierre ROUBAUD (1)

RÉSUMÉ. - Des populations d'embryons de carpe en période de segmentation constituent un nouveau modèle expérimental de populations cellulaires synchronisées, notamment pour des études en cytotoxicologie. Le degré de synchronisation des fécondations est évalué en mesurant le délai d'acquisition d'une tolérance à un choc hyperosmotique. Le degré de synchronisation des développements individuels est évalué jusqu'au stade 8 cellules par l'observation de l'apparition des sillons de division et, jusqu'au 9ème cycle de clivage, en utilisant des données de la littérature concernant les variations de tolérance embryonnaire à des chocs froids ou acides. Le modèle est utilisé en cytotoxicologie sur l'exemple du carbendazime, fongicide antimitotique: des variations cycliques de la tolérance embryonnaire sont mises en évidence pendant 7 cycles de clivage successifs, exprimant les variations de sensibilité du cycle cellulaire des blastomères. L'hypothèse d'une relation entre activité antimitotique et sensibilité initiale de l'embryon de poisson est proposée. Les conditions qui déterminent la résolution dans le temps de l'analyse du cycle cellulaire sont discutées: durée et intensité de l'exposition au toxique, durée du cycle de clivage en relation avec la température, exposition en pulse, relation avec les propriétés toxicocinétiques des toxiques.

ABSTRACT. - Early cleaving carp (*Cyprinus carpio* L.) embryo: an experimental model for toxicologic study.

Populations of simultaneously inseminated carp embryos are proposed as an experimental model of synchronized population of cells, especially useful for cytotoxicologic investigations. The degree of synchronization during fecundation is assessed by measuring the delay in acquiring tolerance to hyperosmotic shock. Synchronization degree during individual developments is assessed by observing cleavage furrow onset up to stage 8 cells, and by interpreting literature data concerning the variations of embryo tolerance to cold or acidic shocks. The model is tested for toxicology on carbendazim, an antimitotic fungicide: cyclic variations of embryo tolerance are observed during 7 successive cleavage cycles. These variations express the underlaying variations of cleaving blastomeres sensitivity. The hypothesis is put forward that fish embryo initial sensitivity to a toxic points out its antimitotic activity. The determining conditions of the resolution of cell cycle temporal analysis are: exposure duration, toxic concentration, cleavage cycle duration correlated to temperature, toxicocinetic parameters.

Mots-clés. - Cyprinidae, *Cyprinus carpio*, Cell cycle, Cleavage, Embryotoxicology, Synchronization.

Dans un grand nombre de groupes systématiques, dont les poissons, une caractéristique majeure de la segmentation de l'oeuf est la succession synchrone,

(1) Groupe d'Embryotoxicologie des Poissons du Laboratoire de Cytophysiologie et Toxicologie Cellulaire, Laboratoire d'Anatomie Comparée, Université Paris 7, 2 Place Jussieu, 75251 Paris cedex 05, FRANCE.
(2) Facultas Perikanan, Pertanian Institute, Bogor J.L. Raya Pajaran, INDONESIA.

isochrone et rapide des premières mitoses, en relation avec l'absence, ou la réduction extrême, de la phase G1 du cycle cellulaire.

Chez les poissons, la fécondation est généralement externe et la prolificité des femelles souvent considérable (Powers, 1989). Il est donc *a priori* possible, en réalisant de nombreuses fécondations simultanées, d'utiliser des populations d'oeufs en segmentation comme des équivalents de populations cellulaires synchronisées. Jaoul et Roubaud (1982), Roubaud *et al.* (1985), Désira *et al.* (1986) ont établi que, lors de l'application de chocs thermiques ou de pH sur de telles populations, l'embryon de carpe passe par des phases successives de tolérance et de sensibilité. L'alternance régulière de ces variations cycliques conduit les auteurs à interpréter les périodes de sensibilité embryonnaire comme l'expression de la sensibilité sous-jacente du cycle cellulaire des blastomères en segmentation et à proposer l'anaphase pour le choc froid et la cytodiérèse pour le choc acide comme étant la phase sensible de ce cycle. Ces résultats ont pu être obtenus parce que toutes les cellules de chacun des embryons parviennent au même moment à l'étape sensible de leur cycle. Suite à ces travaux, nous nous sommes proposé de préciser le degré de synchronisation des cycles cellulaires dans une population d'embryons inséminés simultanément, puis d'illustrer par un exemple les possibilités d'utilisation de ce modèle expérimental dans l'étude toxicologique du cycle cellulaire.

Le choix du modèle oeuf de carpe, *Cyprinus carpio* L., se justifie par les nombreux avantages attachés à cette espèce. Largement répandue, la carpe vit dans les eaux douces, chaudes ou tempérées, de tous les continents non polaires. Par induction hormonale, les géniteurs produisent des gamètes toute l'année s'ils sont soumis à un programme thermique approprié (Jaoul et Roubaud, 1982). Le nombre élevé des oeufs pondus par femelle (100.000 kg de poids vif: Tomita *et al.*, 1980) permet la multiplication des essais comparatifs avec un matériel biologique relativement homogène (Lefèbvre, 1990). La maitrise de la reproduction artificielle rend possible l'insémination simultanée d'un très grand nombre d'ovocytes. Les développements sont obtenus dans des conditions simples: par exemple, les embryons peuvent être incubés par lots de 150 à 200 dans des récipients de 200 ml contenant un milieu oxygéné par bulles d'air et renouvelé chaque jour (Lefèbvre *et al.*, 1990). La transparence de la coque et la possibilité de manipuler l'oeuf à tous les moments de son développement facilitent les observations *in vivo*. Le taux de survie embryonnaire reste pratiquement constant sur un large intervalle de températures (de 13 à 30°C: Reznicenko, 1985), ce qui permet de faire varier la durée des cycles de clivage dans de larges proportions (de 95 min à 12°C à 17 min à 26°C: Ignat'eva, 1976). La synchronisation des mitoses, rigoureuse pour les 4 premiers cycles de segmentation, demeure forte jusqu'au 9ème (Rott, 1980). La mesure fiable et rapide des taux de survie est favorisée par la définition de critères facilement accessibles de mortalité: coagulation du vitellus et des tissus et, chez les embryons libres, immobilité (Lefèbvre, 1990).

Dans le système expérimental "embryon de carpe en segmentation", la synchronisation des mitoses de chacun des embryons de la population dépend du degré de synchronisation des fécondations et des développements individuels.

Chez les poissons, ovocytes et spermatozoïdes sont libérés inactivés dans des liquides d'accompagnement dont l'osmolarité est élevée (environ 300 mosM chez la carpe femelle: Plouidy et Billard, 1982). Lors de leur expulsion dans l'eau douce, les gamètes subissent un choc hypo-osmotique nécessaire à leur activation et à la réussite de la fécondation (Laale, 1980). Le retour à un milieu d'osmolarité élevée (choc hyperosmotique), perturbe les processus de la fécondation dans les premières minutes de l'activation, mais reste ensuite sans effet: l'embryon est alors devenu hyperosmotolérant. Le degré de synchronisation des processus de la fécondation peut donc être évalué par la mesure de la cinétique d'apparition de cet état hyperosmotolérant.

La synchronisation des tout premiers stades des développements individuels peut être évaluée par l'observation de l'apparition des sillons de division.

Dans la perspective de l'utilisation du modèle "embryon de carpe en segmentation" pour des études de toxicologie, la sensibilité embryonnaire à un toxique est mise en relation avec le cycle cellulaire des blastomères. Le modèle moléculaire choisi, le carbendazime, est un pesticide d'usage agricole dont le pouvoir antimitotique (Leroux, 1980) est attribué à une action sur les tubulines du fuseau achromatique (Davidse, 1977). Il est particulièrement actif sur les premières heures du développement de l'embryon de carpe (Gillet et Roubaud, 1983).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Evaluation du degré de synchronisation des développements d'embryons inséminés simultanément

Synchronisation des processus de la fécondation (Fig. 1B)

Des lots de 150 à 200 ovocytes sont inséminés simultanément dans l'eau. Après des temps variables, compris entre 10 sec et 4 min, chacun des lots expérimentaux est brutalement plongé dans un milieu hyperosmotique. Trois heures plus tard, la remise à l'eau des embryons assure leur développement. La cinétique d'acquisition de l'état hyperosmotolérant est évaluée par l'évolution des taux de survie au 2ème jour d'incubation.

Le milieu hyperosmotique a la même composition en ions minéraux que le liquide ovarien de la carpe commune (Plouidy et Billard, 1982), à l'exception des phosphates et des carbonates (NaCl: 121 mM; CaCl2: 2,5 mM; MgCl2: 0,625 mM; KCl: 12 mM). Il contient en outre 80 mM de saccharose et 25 ml de l'agent tampon de pH Tris-Hydroxyméthyl-Aminométhane. Le pH est ajusté à la valeur de 8,2 par HCl et l'osmolarité finale de la solution, mesurée par abaissement du point de congélation, est de 367 mosM.

Synchronisation des développements individuels: critères morphologiques

Des populations d'une centaine d'ovocytes, inséminés simultanément en boite de Pétri et incubés à 20,5°C, sont traitées de 4 min en 4 min à des âges embryonnaires compris entre 40 min (embryon encore indivis) et 120 min (stade 8 cellules) par le mélange fixateur de Stockard (% en vol. dans l'eau distillée: 5v de formaldéhyde à 30%, 6v de glycérol, 4v d'acide acétique glacial). Dans chaque lot expérimental, les embryons fixés sont dénombrés sous la loupe en fonction du cycle mitotique des blastomères: stade indivis (stade 1), transition 1-2 cellules, stade 2 cellules, transition 2-4 cellules, etc.

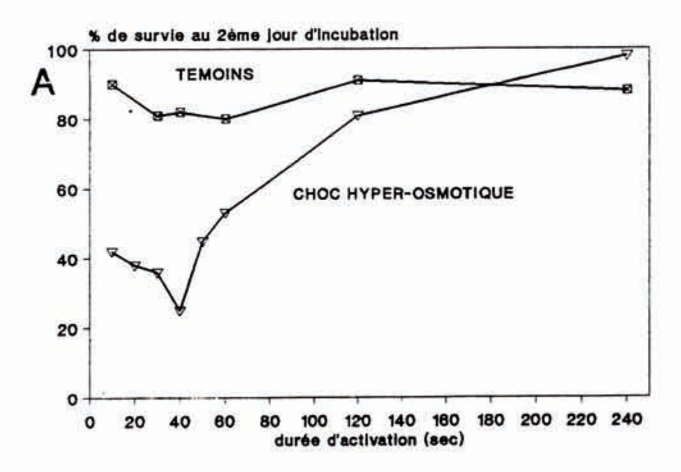
Etude toxicologique du cycle cellulaire

Après dispersion dans 0,5 ml d'éthanol, le carbendazime est utilisé en solutions sursaturées de concentration 10 mg l, préparées extemporanément. Leur pH, compris entre 7,8 et 8,2, est favorable à la fécondation et au développement embryonnaire (Roubaud *et al.*, 1984). L'inocuité de l'éthanol comme dispersant a été démontrée dans ces conditions expérimentales (Lefèbvre, 1990).

Les incubations sont effectuées par lots de 150 à 200 ovocytes inséminés simultanément dans l'eau, pendant les 10 premières heures à des températures constantes de 12°C, 16°C et 16.7°C, puis poursuivies à 20°C.

Les traitements réalisés "en pulse" (Fig. 2E), sont appliqués aux différents lots pendant un temps très court (15 ou 20 min), à des âges embryonnaires décalés d'un temps Δt = 2,5 min ou 8 min suivant les expériences. Les essais couvrent une période plus ou moins étendue comprise entre le stade indivis et l'embryon préblastuléen.

La sensibilité au toxique est évaluée par le taux de survie embryonnaire.



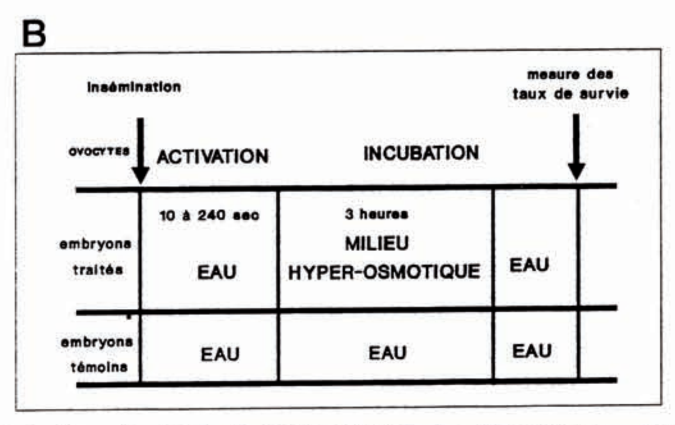


Fig. 1.- Evaluation du degré de synchronisation des fécondations: acquisition de l'hyperosmotolérance. A: □——□: les embryons sont activés et incubés directement dans l'eau. Δ——Δ: après une durée variable d'activation dans l'eau (10 à 240 s), les embryons sont soumis à un choc hyperosmotique (3 h). B: protocole expérimental. [*Estimation of the degree of synchronization of the fertilizations: acquisition of hyperosmotolerance. A: □——□: the embryos are activated and reared in water. Δ——Δ: after a variable duration of activation in water (10 to 240 s), the embryos are submitted to a hyperosmotic shock (3 h). B: experimental procedure.*]

RÉSULTATS

Synchronisation des fécondations (Fig. 1A)

Entre la première et la deuxième minute d'activation dans l'eau les embryons deviennent hyperosmotolérants. Ce délai permet d'évaluer à moins de 2 min le degré de désynchronisation des fécondations dans la population embryonnaire.

Synchronisation des développements (Fig. 3)

Les cinétiques d'apparition et d'achèvement de la formation des sillons de division montrent une synchronisation étroite des développements individuels au cours des 3 premiers cycles cellulaires:

- les sillons de segmentation apparaissent dans un délai de 12 min pour les deux premiers (de la 42ème à la 54ème min et de la 70ème à la 82ème min) et de 8 min pour le troisième (de la 94ème à la 102ème min);
- l'achèvement des sillons de segmentation dure au maximum 8 min pour les deux premiers (de la 54ème à la 62ème min et de la 82ème à la 90ème min) et 4 min pour le troisième (de la 102ème à la 106ème min).

La réduction des variabilités individuelles lors de la transition 4-8 cellules peut s'expliquer par un meilleur discernement de l'état d'achèvement des sillons de division, ou par la disparition progressive, dans les populations à dénombrer, des oeufs anormaux (ovocytes non fécondés ou à développement abortif).

Ces observations permettent d'évaluer à moins de 4 min le décalage maximum dans le temps entre les développements des embryons viables dans une population de 150 à 200 embryons jusqu'à la fin du 3ème cycle de clivage.

Etude toxicologique du cycle cellulaire

A 12°C (Fig. 4: témoins), l'inocuité d'une incubation initiale de 10 heures (limite du domaine de tolérance thermique de l'embryon de carpe: Reznichenko, 1985) est vérifiée.

Une durée d'exposition au toxique de 15 min lors d'une incubation à 16°C (Fig. 5) ne met pas en évidence, de façon certaine, des variations cycliques de tolérance, même après un lissage des courbes par le calcul de la moyenne des taux de survie sur plusieurs points successifs.

Une exposition d'une durée de 20 min permet de faire apparaître des variations cycliques de la tolérance embryonnaire: la période de ces variations est 86 min en moyenne à 12°C (moyenne sur 6 cycles: Fig. 4), 51 min à 16°C (moyenne sur 3 cycles: Fig. 6) et 42 min à 16.7°C (moyenne sur 7 cycles: Fig. 7).

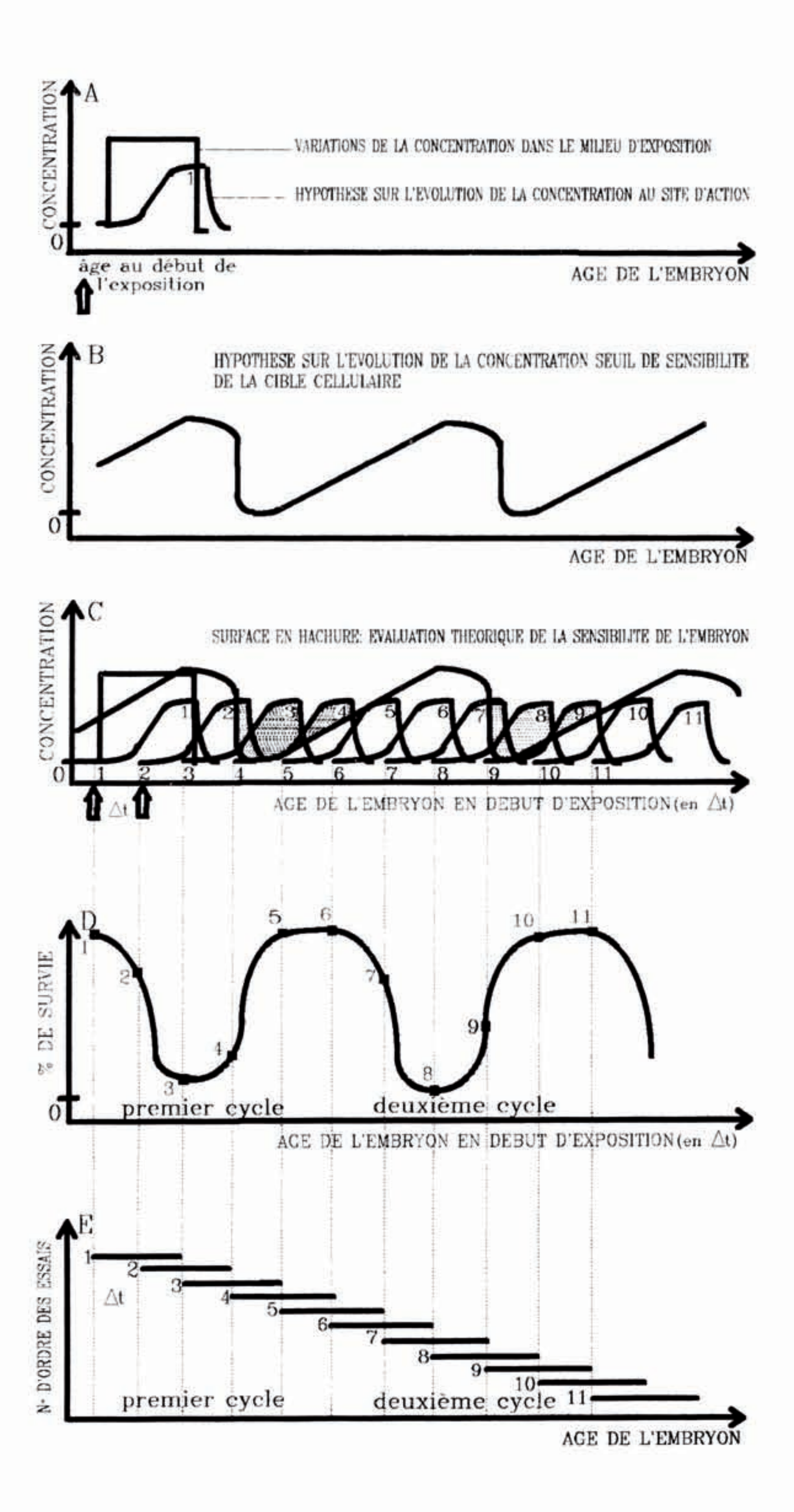
DISCUSSION

Powers (1989) souligne l'intérêt particulier des poissons comme systèmes modèles dans différents domaines de la recherche en biologie, notamment l'embryologie et la toxicologie aquatique. Le modèle "embryon de carpe en segmentation" étend l'utilisation du modèle poisson au domaine des études cytotoxicologiques.

Sensibilité initiale et action antimitotique

Les variations cycliques de tolérance au froid et au carbendazime permettent d'attribuer à une sensibilité spécifique de la mitose la sensibilité globale particulière des premières heures du développement embryonnaire observée pour ces deux agents (Jaoul et Roubaud, 1982, Gillet et Roubaud, 1983). Cette interprétation, cohérente avec les modalités d'action connues du carbendazime et du froid sur les tubulines, permet de poser deux questions symétriques de portée plus générale:

- l'existence d'une sensibilité au cours de la segmentation de l'embryon est-elle l'indication d'un rôle antimitotique de l'agent étudié ? Une réponse positive à cette question conduirait à classer le choc acide parmi les facteurs antimitotiques;
- à l'inverse, une action antimitotique détermine-t-elle nécessairement une sensibilité particulière de l'embryon en segmentation ?


A
CONCENTRATION
VARIATIONS DE LA CONCENTRATION DANS LE MILIEU D'EXPOSITION
HYPOTHESE SUR L'EVOLUTION DE LA CONCENTRATION AU SITE D'ACTION
âge au début de l'exposition
AGE DE L'EMBRYON
B
HYPOTHESE SUR L'EVOLUTION DE LA CONCENTRATION SEUIL DE SENSIBILITE DE LA CIBLE CELLULAIRE
AGE DE L'EMBRYON
C
SURFACE EN HACHURE: EVALUATION THEORIQUE DE LA SENSIBILITE DE L'EMBRYON
AGE DE L'EMBRYON EN DEBUT D'EXPOSITION (en Δt)
D
% DE SURVIE
premier cycle
deuxième cycle
AGE DE L'EMBRYON EN DEBUT D'EXPOSITION (en Δt)
E
N° D'ORDRE DES ESSAIS
premier cycle
deuxième cycle
AGE DE L'EMBRYON

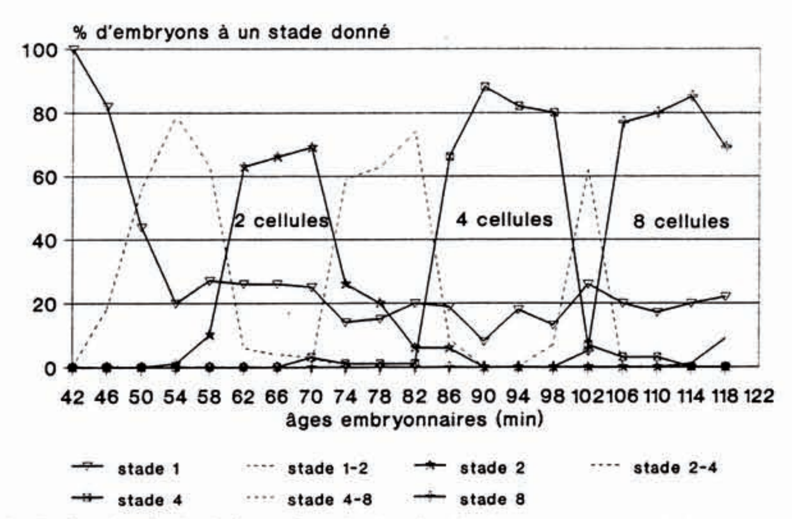


Fig. 3.- Evaluation du degré de synchronisation des développements individuels: critères morphologiques (incubations à 20.5°C). Traits pleins: stades à nombre entier de cellules. Traits en pointillés: stades de transition entre cycles de clivage. [*Estimation of the degree of synchronization of individual developments: morphologic criteria (rearing temperature: 20,5°C). Full lines: stages with a whole number of cells. Dotted lines: transitional stages between two cleavage cycles.*]

Ainsi, lors de l'exposition d'embryons de *Fundulus heteroclitus* à des composés mercuriels, poisons des tubulines (Saint-Georges *et al.*, 1984), le stade le plus sensible est celui de la segmentation précoce (Sharp et Neff, 1982).

Résolution dans le temps de l'analyse des différentes phases du cycle cellulaire

L'utilisation du modèle "embryon de carpe en segmentation" en cytotoxicologie n'est envisageable que si la détermination des phases sensibles du cycle cellu-

---

Fig. 2.- Protocole expérimental d'une exposition en "pulse". Modèle d'interprétation des variations de sensibilité au cours du cycle cellulaire de segmentation. A: une exposition de courte durée provoque, au niveau de la cible cellulaire, une augmentation différée de la concentration en toxique, suivie d'une diminution différée après la fin de l'exposition. B: la sensibilité de la cible cellulaire varie au cours du cycle de clivage. C: les variations de concentration interfèrent avec les variations de sensibilité des cibles. La surface hachurée représente les mortalités induites par une exposition antérieure. D: le cycle d'évolution des mortalités est une expression anticipée du cycle d'évolution de la sensibilité au niveau de la cible. E: l'exposition dure une fraction du cycle cellulaire; les essais successifs sont décalés d'un intervalle de temps Δt inférieur à la durée de l'exposition. [*"Pulse" exposure: experimental procedure. Interpretative pattern of sensitivity variations during cell cycle in cleaving blastomeres. A: at the cellular target level, a short time exposure induces a delayed increase of the toxic concentration, followed by a delayed decrease after the end of the exposure. B: the cellular target sensitivity fluctuates with the cleavage cycle. C: the variations of concentration interfere with the variations of the target sensitivity. Hachured aeras represent the mortalities induced by a previous exposure. D: the cycle variations of the mortalities represent an anticipated expression of the variations of sensitivity at the target level. E: the exposure lasts a fraction of the cleavage cycle; from one trial to the next, the exposure onset is delayed of a fraction of the exposure duration.*]

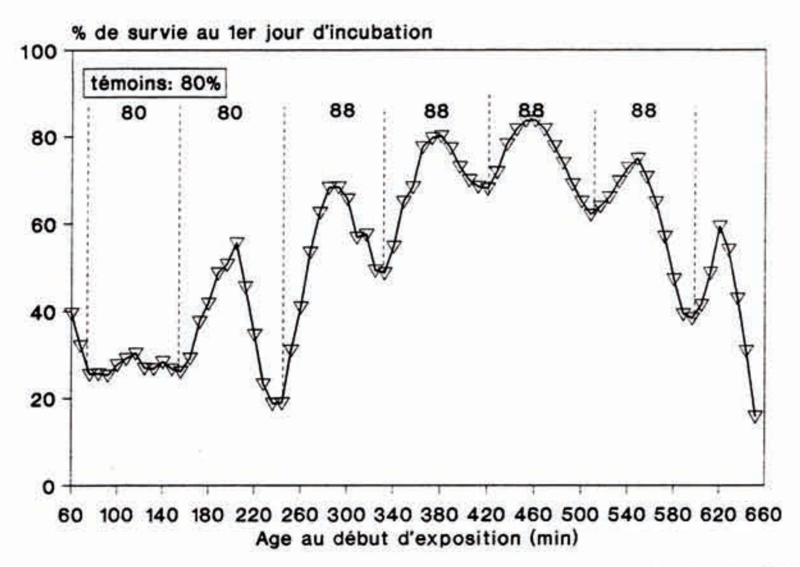


Fig. 4.- Variation cyclique de la tolérance de l'embryon de carpe au carbendazime (10 mg l). Délai entre 2 essais successifs: Δt = 8 min (exposition en pulse). Moyennes des taux de survie sur 2 points successifs. [*Cycle variation of the carp embryo tolerance to carbendazim (10 mg l). Pulse exposure delay: Δt = 8 min. The survival ratio averages are computed with 2 running points.*]

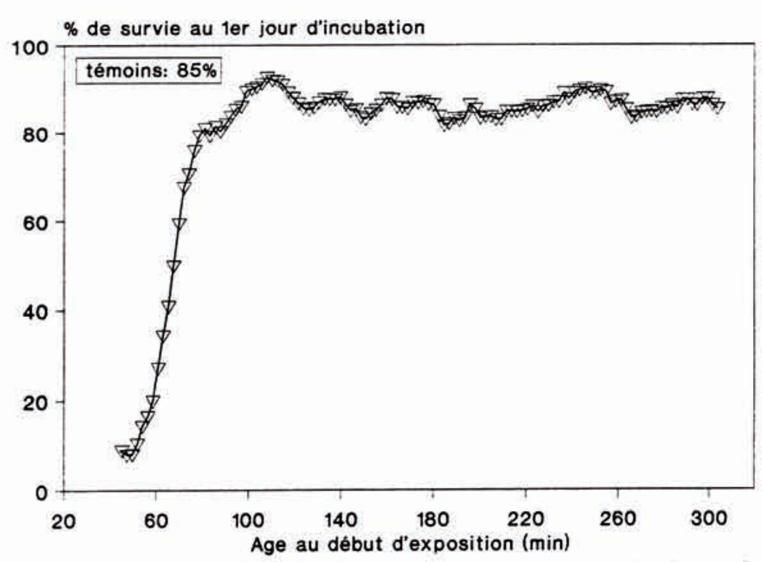


Fig. 5.- Variation cyclique de la tolérance de l'embryon de carpe au carbendazime (10 mg/l). Délai entre 2 essais successifs: Δt = 2.5 min (exposition en pulse). Moyennes des taux de survie sur 5 points successifs. [*Cycle variation of the carp embryo tolerance to carbendazim (10 mg/l). Pulse exposure delay: Δt = 2.5 min. The survival ratio averages are computed with 5 running points.*]

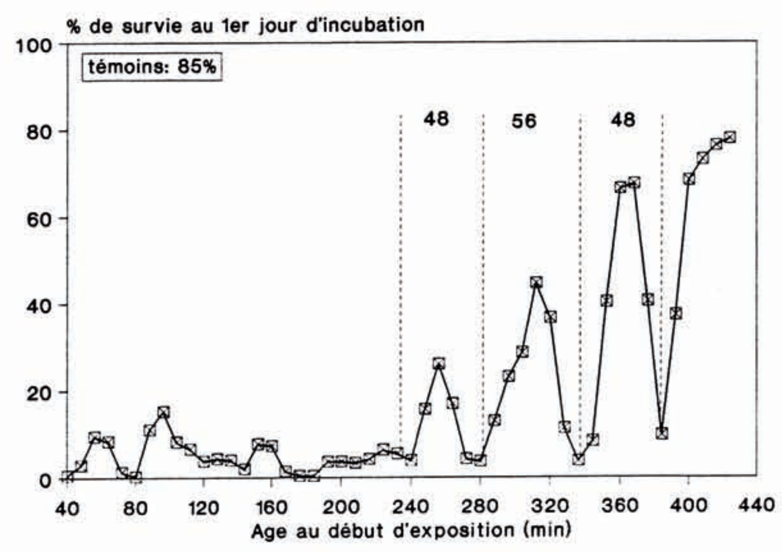


Fig. 6.- Variation cyclique de la tolérance de l'embryon de carpe au carbendazime (10 mg/l). Délai entre 2 essais successifs: Δt = 8 min (exposition en pulse). Moyennes des taux de survie sur 2 points successifs. [*Cycle variation of the carp embryo tolerance to carbendazim (10 mg/l). Pulse exposure delay: Δt = 8 min. The survival ratio averages are computed with 2 running points.*]

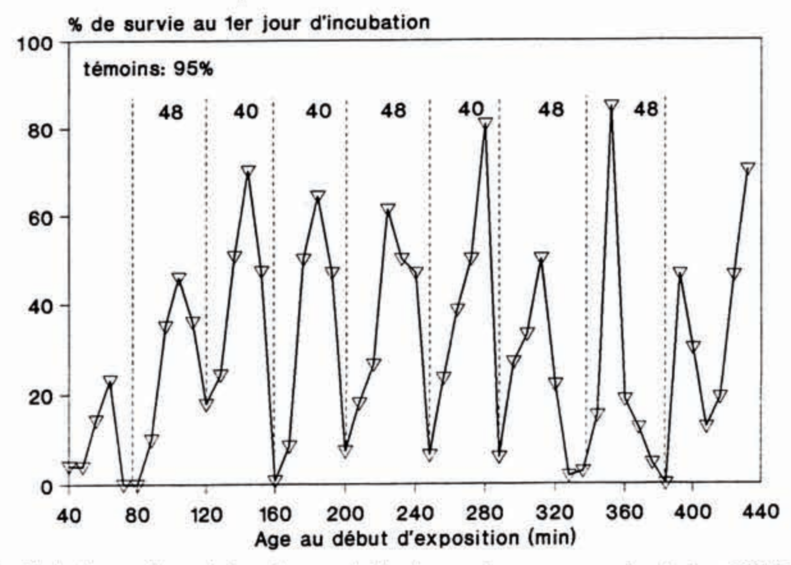


Fig. 7.- Variation cyclique de la tolérance de l'embryon de carpe au carbendazime (10 mg/L). Délai entre 2 essais successifs: Δt = 8 min (exposition en pulse). [*Cycle variation of the carp embryo tolerance to carbendazim (10 mg/l). Pulse exposure delay: Δt = 8 min).*]

laire est précise. Or, celle-ci dépend de la synchronisation des développements individuels au sein de la population d'embryons et des caractéristiques de l'exposition au toxique.

Dans nos conditions expérimentales, l'évaluation du degré de désynchronisation (moins de 4 min) des fécondations et des développements jusqu'au 3ème cycle de clivage recoupe celle qui peut être déduite, jusqu'au 4ème cycle, des données de la littérature sur les variations de la tolérance embryonnaire à des chocs froids (Roubaud *et al.*, 1985) et des chocs acides (Desira *et al.*, 1986). Ces décalages entre développements individuels, bien que relativement réduits, imposent une limite à la résolution des analyses accessibles avec le modèle expérimental: des améliorations de la synchronisation des développements individuels sont donc recherchées.

Les modalités de l'exposition au toxique sont ajustées pour induire, au cours de chaque cycle de clivage, des variations maximales de la survie embryonnaire ultérieure: expositions successives nombreuses, de courte durée, avec une concentration élevée en toxique. La multiplication des essais successifs au cours d'un même cycle augmente le degré de résolution des analyses. Elle peut être mise en oeuvre aussi bien par un allongement de la durée du cycle (abaissement de la température d'incubation) que par une diminution de la durée de l'exposition. L'inocuité démontrée d'incubations à 12°C pendant la segmentation permet de porter la durée des cycles de clivage à plus de 80 min.

Le choix de la durée d'exposition doit être celui de la plus petite fraction du cycle cellulaire permettant une expression manifeste des effets toxiques. La recherche de durées d'exposition réduites conduit donc à augmenter la concentration en toxique. Ainsi, une concentration de 10 mg/l de carbendazime cesse d'être suffisante pour induire des effets létaux significatifs lorsque la durée d'exposition diminue de 20 min à 15 min. Cependant, pour un grand nombre de toxiques, l'augmentation de la concentration est limitée par leur faible solubilité dans l'eau (5,8 mg/l pour le carbendazime: The Pesticide Manual, 1987), même s'il est possible de pallier cette difficulté en ayant recours à des solutions sursaturées.

La recherche de critères d'activité toxique plus sensibles que le taux de survie embryonnaire avant éclosion (mesure des taux de survie au delà de l'éclosion, définition de critères d'activité sublétale) pourrait permettre de réduire la durée d'exposition sans augmenter la concentration.

Le recours à des expositions "en pulse" augmente la résolution des analyses, mais l'interprétation des résultats peut être rendue difficile par les possibles chevauchements d'effets entre expositions successives, surtout si le cycle cellulaire admet plusieurs phases de sensibilité.

Détermination des cibles cellulaires

Nos observations indiquent la possibilité d'utiliser la mesure de l'activité toxique (toxicométrie) pour déterminer les cibles des toxiques (toxicodynamie). Cependant, en fonction des propriétés toxicocinétiques des xénobiontes, le moment déterminé comme période sensible apparente (moment d'une exposition suivie d'effets) diffère plus ou moins de celui où la cible cellulaire est touchée (Fig. 2). En effet, la période sensible apparente dépend de la vitesse de pénétration du xénobionte jusqu'à sa cible, de son élimination à ce niveau et de sa possible séquestration dans l'embryon. Par ailleurs, les variations de la tolérance peuvent résulter de variations cycliques des propriétés toxicocinétiques de l'oeuf: variations périodiques des pH intracellulaires, de la perméabilité membranaire, mouvements de l'oeuf dans sa coque (Komm et Reznicenko, 1968) qui pourraient conditionner la pénétration des xénobiontes.

Une détermination précise des cibles cellulaires par l'étude des variations cycliques de la tolérance de l'embryon en segmentation demandera donc que les caractéristiques toxicocinétiques des xénobiontes soient connues.

Intérêt d'une population cellulaire naturellement synchronisée

En cytologie, les phases du cycle cellulaire sont étudiées sur des cultures cellulaires artificiellement synchronisées. Les procédés variés utilisés pour la synchronisation (Bhuyan et Groppi, 1989) présentent de nombreuses difficultés d'utilisation. Leur coût en temps et moyens est élevé et ils portent sur des cycles de durée relativement longue (jusqu'à plusieurs dizaines d'heures). Ils reposent soit sur le blocage biochimique en une phase particulière du cycle soit sur la séparation physique des cellules suivant leur stade: ces manipulations perturbent le métabolisme et la viabilité, de sorte que, dans les études toxicologiques, il arrive que la toxicité paraisse dépendre du procédé choisi pour la synchronisation. Par ailleurs, après reprise du développement des cultures, une désynchronisation rapide empêche d'étudier la toxicité sur des cycles cellulaires complets et, *a fortiori*, successifs. Enfin, la synchronisation obtenue reste relative, les cellules n'étant pas arrêtées ou récoltées au même stade, leurs processus physiologiques internes pouvant même être désynchronisés. Jusqu'à présent, à notre connaissance, ces procédés n'ont pu être utilisés pour l'étude toxicologique des phases de la mitose.

L'énoncé de ces limites et difficultés d'utilisation met en évidence l'intérêt du modèle "embryon de carpe en segmentation": synchronisation naturelle, faible durée du cycle cellulaire (mais pouvant être largement augmentée ou réduite à volonté), prolongation possible sur plusieurs cycles cellulaires successifs sans perturbation métabolique, utilisation du développement embryonnaire comme "caisse de résonance" sensible des effets toxiques. Cependant, comme tout modèle, l'embryon de carpe en segmentation présente aussi des limites d'utilisation. En particulier, la phase G ne peut être étudiée puisqu'elle est réduite à l'extrême ou absente des mitoses de segmentation. De plus, l'inertie toxicocinétique due à la présence des annexes périembryonnaires (coque et espace périvitellin) et intraembryonnaire (vésicule vitelline) peut rendre difficile l'interprétation cytologique des sensibilités embryonnaires observées.

CONCLUSION

A différentes températures, la période des variations cycliques de la tolérance embryonnaire au carbendazime correspond à celle du cycle cellulaire des blastomères en segmentation. Cette relation, déjà établie pour un choc froid (Roubaud *et al.*, 1985) et pour un choc acide (Desira *et al.*, 1986) est manifeste parce que toutes les cellules de chacun des embryons parviennent au même moment à l'étape sensible de leur cycle; ainsi, une population issue d'ovocytes inséminés simultanément se comporte comme une population de cellules synchronisées avec un écart de synchronisation certainement inférieur à 4 min jusqu'au 4ème cycle de clivage. Une population d'embryons de carpe en segmentation se révèle donc un modèle expérimental nouveau pour des études toxicologiques du cycle cellulaire.

Remerciements. - Nous remercions MM Frédéric BAGES, Olivier DIGNE et Oscar LIMA qui nous ont aidés pour la réalisation de ce travail, ainsi que le personnel des Installations Piscicoles Expérimentales de l'INRA. Ce travail a bénéficié du soutien du Ministère de l'Environnement (Commission Contrôle des Produits, contrats 83261 et 87101).

RÉFÉRENCES

BHUYAN B.K. & V.E. GROPPI, 1989. - Cell cycle inhibitors. *Pharmac. Ther.*, 42: 307-348.

DAVIDSE L.C., 1977. - Mode of action, selectivity and mutagenecity of benzimidazole compounds. *Neth. J. Pl. Path.*, 83: 135-144.

DE SAINT-GEORGES L., VERSCHAEVE L. & A. LEONARD, 1984. - Inhibition par le chlorure de méthyl mercure et le chlorure de mercure de la polymérisation *in vitro* des microtubules. *C. R. Soc. Biol.*, 178: 562-566.

DESIRA T., ROUBAUD P., CHAILLOU C., GILLET C. & P. REINAUD, 1986. - Tolérance physiologique de l'oeuf de carpe (*Cyprinus carpio* L.) à un choc acide appliqué au cours de l'activation ou pendant les premières divisions de segmentation. *Reprod. Nutr. Develop.*, 26: 396-407.

GILLET C. & P. ROUBAUD, 1983. - Influence sur la survie jusqu'à éclosion des embryons de carpe (*Cyprinus carpio* L.) après traitement, pendant la fécondation et le développement précoce, par le carbendazime, un fongicide antimitotique de synthèse. *Water Res.*, 17: 1343-1348.

IGNAT'EVA G.M., 1976. - Regularities of early embryogenesis in teleost as revealed by studies of the temporal pattern of development. The duration of the mitotic cycle and its phases during synchronous cleavage divisions. *Wihl. Roux'Arch. Dev. Biol.*, 179: 301-312.

JAOUL A. & P. ROUBAUD, 1982. - Résistance de l'oeuf de carpe commune (*Cyprinus carpio* L. Cyprinidae) à des chocs thermiques chauds ou froids. *Can. J. Zool.*, 60: 3409-3419.

KOMM S.G. & P.N. REZNICHENKO, 1968. - L'activité motrice embryonnaire des poissons osseux. *Section cinématogr. exp. médic., Acad. Sc. URSS, Moscou*, nA.219, Baliskaya Ylitsa.

LAALE H.W., 1980. - The perivitelline space and egg envelopes of bony fishes: a review. *Copeia*, 2: 210-226.

LEFEBVRE B., 1990. - Bases méthodologiques et conceptuelles de l'embryotoxicologie des poissons. *Thèse Univ. Paris VII*, 159 pp.

LEFEBVRE B., CHAILLOU C., MARIE D., HANAFI C. & P. ROUBAUD, 1990. - Embryotoxicométrie des poissons: problèmes méthodologiques soulevés par l'élaboration d'un test utilisant l'oeuf de carpe. *In*: Relations entre les traitements phytosanitaires et la reproduction des animaux (Ministère de la Recherche et de la Technologie). *Ann. Ass. Nat. Protection des Plantes*, 2: 161-177.

LEROUX L., 1980. - Les fongicides. *Persp. agric.*, 41: 22-38.

PLOUIDY M.G. & R. BILLARD, 1982. - The chemical composition of the companion fluids of the gametes in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *In:* Reproductive Physiology of Fish. *Proc. Int. Symp. Reprod. Physiol. Fish.* (C.J.J. Richter & H.J.Th. Goos, eds), Center for Agricultural Publ. and Doc. Wageningen.

POWERS D.A., 1989. - Fish as model systems. *Science*, 246: 352-358.

REZNICENKO P.N., 1985. - Topical problems of ichthyology, *Trans. Czechosl.- Soviet Ichthyol. Coop.*, 2: 107-132.

ROTT N.M., 1980. - Cell divisions during the pregastrulation period of development. *Ontogenez*, 11: 3-23.

ROUBAUD P., GILLET C. & R. BILLARD, 1984. - Influence du pH du milieu au cours de la fécondation sur la survie embryonnaire de la carpe commune (*Cyprinus carpio* L.). *Can. J. Zool.*, 62: 851-861.

ROUBAUD P., CHAILLOU C. & D. SJAFEI, 1985. - Variations cycliques de la tolérance à un choc thermique froid appliqué au cours de la segmentation de l'embryon de la carpe commune (*Cyprinus carpio* L.). *Can. J. Zool.*, 63: 657-663.

SHARP J.R. & J.M. NEFF, 1982. - The toxicity of mercuric chloride and methylmercuric chloride to *Fundulus heteroclitus* embryos in relation to exposure conditions. *Env. Biol. Fish.*, 7: 277-284.

The Pesticid Manual, Worthing C.R. (ed.), 1987. - 8th edt., British Corp. Protect. Council, London, 234-235.

TOMITA M., IWAHASHI M. & R. SUSUKI, 1980. - Number of spawned eggs and ovarian eggs and egg diameters and per cent eyed eggs with reference to the size of the female carp. *Bull. Jap. Soc. Fish.*, 46: 1077-1081.

Reçu le 13.05.1991.
Accepté pour publication le 15.10.1991.